

Streszczenie pracy doktorskiej mgr Aleksandry Ulman

prof. dr hab. Marcin Majka – promotor

dr Klaudia Skrzypek – promotor pomocniczy

Temat pracy doktorskiej: „*Study of SNAI1 gene impact on differentiation of induced pluripotent stem cells into skeletal muscle in the context of rhabdomyosarcoma development*”

(„*Badanie wpływu genu SNAI1 na proces różnicowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych do mięśni szkieletowych w kontekście rozwoju mięsaka prążkowanokomórkowego*”) – cykl publikacji

Artykuł nr 1

Ulman, A.; Skrzypek, K.; Konieczny, P.; Mussolino, C.; Cathomen, T.; Majka, M.

Genome Editing of the SNAI1 Gene in Rhabdomyosarcoma: A Novel Model for Studies of Its Role.

Cells 2020, 9, 1095. <https://doi.org/10.3390/cells9051095>

Edytowanie genomu razem z technologią interferencji RNA jest szeroko wykorzystywane w modulacji ekspresji genów przy tworzeniu modeli badawczych w badaniach nad nowotworami. Każde z tych narzędzi inżynierii genetycznej charakteryzuje unikatowy mechanizm działania. Do edycji genomu wykorzystuje się głównie system nukleaz CRISPR/Cas9 (ang. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) oraz TALEN (ang. transcription activator-like effector nucleases). Nukleazy mają zdolność generowania precyzyjnych pęknięć dwuniciowego DNA, które w wyniku działania procesów naprawczych mogą prowadzić do inaktywacji określonego genu. Z kolei oddziaływanie interferencyjnego RNA (np. shRNA ang. short-hairpin RNA) z określonym transkryptem może skutkować obniżeniem ekspresji genu.

W niniejszym artykule wykorzystano trzy różne metody modulacji ekspresji genu SNAI1 w komórkach mięsaka prążkowanokomórkowego (RMS). Celem pracy było zaprojektowanie systemów CRISPR/Cas9 oraz TALEN i porównanie efektywności ich działania z technologią shRNA w obniżaniu poziomu ekspresji SNAI1 wraz z weryfikacją uzyskanego efektu biologicznego.

Po zaprojektowaniu miejsc docelowych dla CRISPR/Cas9 i TALEN, do komórek alveolarnej linii RMS RH30 wprowadzono osobno każdy z systemów oraz shRNA. Zbadano ich wpływ na sekwencję genu SNAI1 oraz poziom ekspresji transkryptu i białka. W każdym z przypadków odpowiednio obniżenie lub kompletne wyłączenie ekspresji SNAI1 prowadzi do zmian morfologicznych komórek i powoduje podwyższenie poziomu ekspresji transkryptów genów związanych z miogenezą

(MYOD, MYOG, MHC, MSTN i MEF2A) i tendencję do obniżenia poziomu deacetylazy HDAC1/2.

Uzyskane wyniki potwierdziły skuteczność metod poprzez uzyskanie analogicznego efektu biologicznego - zoptymalizowano trzy różne metody modulacji ekspresji SNAIL które mogą być wykorzystane w dalszych badaniach. Niemniej jednak niska wydajność edycji genomu zarówno metodą TALEN jak i CRISPR/Cas9 jest istotnym czynnikiem limitującym. Należy również zwrócić uwagę, że shRNA powoduje obniżenie poziomu SNAIL, natomiast w wyniku aktywności CRISPR/Cas9 i TALEN można uzyskać całkowite wyłączenie genu. Te techniki zostaną wykorzystane w dalszych badaniach nad rolą SNAIL w RMS.

Artykuł nr 2

Ulman, A.; Kot, M.; Skrzypek, K.; Szewczyk, B.; Majka, M. Myogenic Differentiation of iPS Cells Shows Different Efficiency in Simultaneous Comparison of Protocols. *Cells* 2021, 10, 1671. <https://doi.org/10.3390/cells10071671>

Indukowane pluripotencjalne komórki (iPS, *ang. induced pluripotent stem cells*) dzięki swojej zdolności różnicowania w kierunku trzech listków zarodkowych mogą być wykorzystywane do badań procesów zachodzących podczas ludzkiego rozwoju embrionalnego, w tym miogenezy. W literaturze można znaleźć wiele protokołów opisujących różnicowanie komórek iPS w kierunku mięśni szkieletowych. Różnią się one składnikami pożywek hodowlanych, użytymi modulatorami szlaków sygnałowych, odpowiednikami podścieliska i czasem trwania.

Celem badań była ocena i porównanie trzech różnych protokołów różnicowania komórek iPS do mięśni szkieletowych wraz ze szczegółową charakterystyką uzyskanych komórek.

Dlatego komórki iPS poddano różnicowaniu do mięśni szkieletowych bazując na trzech różnych protokołach opisanych wcześniej w literaturze. Protokół I opierał się na indukcji różnicowania poprzez tworzenie ciałek embrionalnych, suplementacji ITS (*ang. Insulin-Transferrin-Selenium*) i selekcji na podstawie zdolności do adhezji komórek do kolagenu typu I. Protokół II również rozpoczynał się od etapu ciałek embrionalnych, ale z silnym ukierunkowaniem w stronę mięśniową na skutek dodania do medium inhibitora GSK3- β - BIO, forskoliny i bFGF (*ang. basic fibroblast growth factor*). Natomiast protokół III był cały czas prowadzony w monowarstwie,

z zastosowaniem trzech specjalnych mediów opierających się na aktywacji szlaku WNT i inhibicji szlaków związanych z TGF- β i BMP.

Weryfikacja miogennego ukierunkowania komórek była sprawdzana w każdym z protokołów na podstawie poziomu ekspresji mięśniowych czynników regulatorowych *MYF5*, *MYOD*, *MYF6* i *MYOG* oraz markerów mięśniowych *MYH3* i *MYH2* w różnych punktach czasowych. Z wykorzystaniem analizy cytometrycznej zbadano ekspresję markerów powierzchniowych CD10, CD24 i CD56. Oceniono również zdolność komórek do fuzji i ekspresji wimentyny.

Uzyskane wyniki wykazały, że komórki różnicowane według protokołu III wykazują najwyższy poziom ekspresji regulatorowych czynników miogennych. Charakteryzuje je też najwyższy poziom *MYH3* i *MYH2*. Protokół III jest najbardziej wydajny w różnicowaniu komórek iPS w kierunku komórek mięśniowych. Co więcej wykazano, że marker powierzchniowy CD56 nie jest specyficznym wyznacznikiem poziomu zróżnicowania komórek w kierunku mięśni szkieletowych. Uzyskane wyniki będą wykorzystane w dalszych badaniach nad rolą SNAIL w miogenezie.

Streszczenie w języku angielskim

Article no 1

Ulman, A.; Skrzypek, K.; Konieczny, P.; Mussolino, C.; Cathomen, T.; Majka, M. Genome Editing of the *SNAI1* Gene in Rhabdomyosarcoma: A Novel Model for Studies of Its Role. *Cells* 2020, 9, 1095.

Gene expression modulation with genome editing (GE) tools and RNA interference technology is widely used in tumor research. GE utilizes clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 or transcription activator-like effector nucleases (TALEN) tools to generate precise double-strand breaks in the DNA structure. Induced repair mechanisms may lead to gene knockout. shRNA leads to the gene knockdown as the result of the interaction with the targeted transcript.

In the current study, three different methods for *SNAI1* knockout or knockdown in rhabdomyosarcoma (RMS) cells were compared

The aims of the study were to design CRISPR/Cas9 and TALEN systems targeting *SNAI1* and to compare their effectiveness and biological effects with shRNA. Therefore, CRISPR/Cas9, TALEN and shRNA tools were introduced separately to the cells. Next, the genome sequence, transcript levels, and protein expression levels of *SNAI1* were evaluated. The biological effects of *SNAI1* expression modulation were accompanied by changes in the morphology of the cells and modulation of the expression of myogenic factors (*MYOD*, *MYOG*, *MHC*, *MSTN* and *MEF2A*) and HDAC1. We confirmed the similar effectiveness of the tested methods. Nevertheless, the low efficiency of the GE tools was a limiting factor in obtaining biallelic gene knockouts. To conclude, we established and characterized three different methods of *SNAI1* expression modulation: knockout with GE tools and knockdown with shRNA technology. These results will be used in further studies investigating the role of *SNAI1* in RMS.

Article no 2

Ulman, A.; Kot, M.; Skrzypek, K.; Szewczyk, B.; Majka, M. Myogenic Differentiation of iPS Cells Shows Different Efficiency in Simultaneous Comparison of Protocols. *Cells* 2021, 10, 1671.

Induced pluripotent stem (iPS) cells with their ability to differentiate into three germ layers constitute a perfect tool to study human embryo development processes such as myogenesis. Currently, many protocols describing the differentiation of iPS cells into myogenic cells have been described in the literature. They differ in many aspects, such as media components, including signaling modulators, feeder layer constituents, and duration of culture.

The aim of the current study was to verify and compare, side by side, three different protocols of skeletal muscle differentiation with the characteristics of the obtained cells. Therefore, iPS cells were differentiated using protocols previously described in the literature. Protocol I was based on embryonic bodies differentiation induction, ITS addition, and selection with adhesion to collagen I type. Protocol II started with strong myogenic induction at the embryonic bodies step with BIO, forskolin, and bFGF. Protocol III utilizes monolayer cell culture in three special media, leading to WNT activation and TGF- β and BMP signaling inhibition.

Myogenic induction was confirmed by the hierarchical expression of myogenic regulatory factors *MYF5*, *MYOD*, *MYF6* and *MYOG*, as well as the expression of myotubes markers *MYH3* and *MYH2*, in each protocol in different time points. Obtained cells were characterized by the presence of the extracellular markers CD10, CD24 and CD56 using flow cytometry. Cell fusion ability and vimentin presence with immunofluorescence were verified. Our results revealed that protocol III is the most efficient in obtaining myogenic cells. Furthermore, our results indicated that CD56 is not a specific marker for the evaluation of myogenic differentiation. Obtained results will be used in further studies investigating the role of SNAI1 in RMS.